

539,874

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
1. Juli 2004 (01.07.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/054497 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: **A61K**
- (21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/DE2003/004233**
- (22) Internationales Anmeldedatum:
16. Dezember 2003 (16.12.2003)
- (25) Einreichungssprache: **Deutsch**
- (26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**
- (30) Angaben zur Priorität:
102 59 619.0 18. Dezember 2002 (18.12.2002) **DE**
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **METAGEN PHARMACEUTICALS GMBH** [DE/DE]; Oudenarder Strasse 16, 13347 Berlin (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **PLATH, Thomas** [DE/DE]; Oudenarder Strasse 16, 13347 Berlin (DE). **REULE, Matthias** [DE/DE]; Oudenarder Strasse 16, 13347 Berlin (DE). **KAISER, Simone** [DE/DE]; Oudenarder Strasse 16, 13347 Berlin (DE).
- (74) Anwalt: **JUNGBLUT, Bernhard**; Albrecht, Lüke & Jungblut, Gelfertstrasse 56, 14195 Berlin (DE).

- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

BEST AVAILABLE COPY

(54) Title: **USE OF A TRPM8-ACTIVATING SUBSTANCE FOR THE TREATMENT OF TUMOURS**

(54) Bezeichnung: **VERWENDUNG EINER TRPM8 AKTIVIERENDEN SUBSTANZ ZUR TUMORBEHANDLUNG**

(57) Abstract: The invention relates to the use of a TRPM8-activating substance for producing a pharmaceutical composition for the treatment of tumour diseases in which TRPM8 is over-expressed.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft die Verwendung einer TRPM8 aktivierenden Substanz zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Tumorerkrankungen, in welchen TRPM8 überexprimiert ist.

WO 2004/054497 A2



Verwendung einer TRPM8 aktivierenden Substanz zur Tumorbehandlung.

5 Gebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft die Verwendung von TRPM8 modulierenden Substanzen zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Tumorerkrankungen. Die
10 Erfindung betrifft desweiteren solche Zusammensetzungen, sowie einen Behandlungsplan.

Hintergrund der Erfindung und Stand der Technik

15

Folgend werden die Bezeichnungen Trpp8 und TRPM8 synonym verwendet.

Die Kalzium Homeostase regelt wichtige Zellfunktionen, wie
20 Proliferation, Differenzierung, Invasion, Migration, Angiogenese und Apoptose. Bei Prostatakrebs spielt Kalzium eine wichtige Rolle in der Tumorbildung. Es ist jedoch wenig über die Kalziumkanäle und membrangebundenen Plasma Rezeptoren bekannt, die den Eintritt und Austritt von Kal-
25 zium in und aus intrazellulären Kalziumreservoirs in Prostatatumorzellen regeln.

Trpp8 ist in der Literaturstelle Tsavaler et al., Cancer Res, 61:3760-3769 (2001) als Prostata-spezifisches Gen
30 beschrieben worden, welches vorwiegend in humanen Prostatatumoren exprimiert wird. Trpp8 wird signifikant hochreguliert. In Androgen-abhängigen Prostata Zelllinien wird gemäß dieser Literaturstelle Trpp8 gefunden, nicht jedoch

in Androgen-unabhängigen Zelllinien, welche auch nicht PAP (prostate acid phosphatase) und PSA (prostate specific antigen) exprimieren. Es wird vermutet, daß Trpp8 als Kalzium Kanal Protein funktioniert.

5

Trp Proteine sollen zu den sogenannten store operated calcium channels (SOC) bzw. capacitative calcium entry channels (CCE) gehören. In LNCaP Zellen konnte eine Involvierung in der Apoptose gezeigt werden (Wertz et al., J Biol Chem, 275:11470-11477 (2000)).

Die 5694 bp Trpp8 cDNA hat einen 3312 bp offenen Leserahmen, welcher für ein 1104 Aminosäuren Protein mit angeblich sieben transmembranen Domänen codiert mit einem Molekulargewicht von ca. 127.500 Da.

Trpp8 Sequenzen sind in den Literaturstellen US-6,194,152, US-6,183,968, WO-99/46374, WO-99/09166, WO-01/25273, WO-01/25272, WO-01/34802, WO-01/46258, WO-01/42467 und WO-01/1633 beschrieben. Die Literaturstellen US-6,194,152 und WO-01/51633 offenbaren die Verwendung der darin genannten Sequenzen zur Detektion von Tumorzellen sowie verschiedener Substanzklassen in allgemeiner Weise zur Behandlung von Prostatakrebs.

25

Menthol ist ein sekundärer Pflanzenstoff, der natürlicherweise als Monoterpen in der Pfefferminze vorkommt und den Hauptbestandteil des Pfefferminzöls ausmacht. Menthol induziert Kälteempfinden auf der Haut sowie in Mund und Nase durch Anregung bestimmter Nervenzellen. Eine weitere, ein Kälteempfinden auslösende Substanz ist Icilin. Beide Substanzen aktivieren periphere Nervenzellen, wobei der Ionenkanal TRPM8 selektiv aktiviert wird und Ionen, wie

Ca²⁺ und Na⁺ in die Zelle einfließen können. Aus den Literaturstellen McKemy et al., Nature 416(6876):52-52 (2002) und Peier et al., Cell 108(5):705-715 (2002) ist es bekannt, dass das human-orthologe TRPM8 in Mäusen und Ratten als Mentholsensor funktioniert. Gleiches ist für Icilin bekannt. Ferner fungiert TRPM8 als Kälterezeptor in einem Temperaturbereich von 8 °C bis 25 °C.

Eine physiologische Funktion von TRPM8 in Tumorgewebe ist unbekannt.

Insbesondere Prostatakrebs ist eine mit zunehmendem Alter mit beachtlicher Inzidenz auftretende Erkrankung. Bislang wird Prostatakrebs im wesentlichen pathologisch diagnostiziert und meist durch Entfernung der Prostata behandelt. Die Entfernung der Prostata hat verschiedene nachteilige Effekte auf einen Patienten. Eine verbesserte Diagnose und Behandlung dieser Krebsart, insbesondere ohne das Erfordernis einer Entfernung der Prostata, ist daher in hohem Maße wünschenswert.

25 Technisches Problem der Erfindung

Der Erfindung liegt das technische Problem zugrunde, pharmazeutische Zusammensetzungen zur Behandlung von Tumorerkrankungen, insbesondere Prostatakrebs-Erkrankungen, anzugeben.

Grundzüge der Erfindung sowie bevorzugte Ausführungsbeispiele.

Zur Lösung dieses technischen Problems lehrt die Erfindung
5 die Verwendung einer TRPM8 aktivierenden Substanz zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Tumorerkrankungen, insbesondere von Prostatakrebs, in welchen TRPM8 überexprimiert ist.

10 Die Erkenntnis beruht auf der überraschenden Erkenntnis, dass in Tumoren, die eine erhöhte Expression des Ionenkanals TRPM8 aufweisen, die Aktivierung des TRPM8 das Tumorstadium inhibiert bzw. verlangsamt. Insbesondere eine permanente Aktivierung destabilisiert spezifisch den Ionenhaushalt der Tumorzellen, welche dadurch in die Apoptose getrieben werden.
15

Bevorzugt eingesetzt wird eine Substanz, welche ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus "Menthol, Menthyllderivate, Pyrrolidinyl-Derivate des Furanon, Icilin, Icilin-Derivate und Mischungen dieser Substanzen". Der Begriff Menthol umfaßt alle Enantiomere sowie Mischungen der Enantiomere. Entsprechendes gilt für andere genannte Substanzen bzw. Substanzklassen mit Symmetriezentren. Desweiteren
20 können auch strukturell von den vorstehenden Substanzen verschiedene Substanzen verwendet werden, wobei als wesentliches Auswahlkriterium die Aktivierung von TRPM8 anzusehen ist. Beispiel für eine solche verschiedene Substanz ist 2-Isopropyl-N-2,3-trimethylbutyramid.
25

30

Menthyllderivate können insbesondere gemäß Formel I aufgebaut sein, wobei ... eine Einfach- oder Doppelbindung sein kann, wobei ... eine Einfachbindung oder keine Bindung

sein kann, wobei nicht dargestellte Valenzen des Kohlenstoffs mit -H abgesättigt sind, wobei R1 = -H, -OH, -SH, -NR11R12, C1-C10-Alkyl, -Aralkyl oder -Aryl, beispielsweise Methyl oder Ethyl, wobei R11 und R12 gleich oder verschieden und -H, C1 bis C10-Alkyl, -Aralkyl oder -Aryl sein können, wobei R2 = -OR21, -SR21, -CO-R22, oder -O-CO-R23 sein kann, wobei R21 = -H, C1-C10-Alkyl, -Aralkyl, -Aryl, oder C1-C10-Alkylpolyether mit 1 bis 5 Ethergruppen, nicht, einfach oder mehrfach substituiert, insbesondere -OH oder -SH substituiert, sein kann, wobei R22 = -H, C1-C10-Alkyl, -Aralkyl, -Aryl, oder C1-C10-Alkylpolyether mit 1 bis 5 Ethergruppen, nicht, einfach oder mehrfach substituiert, insbesondere -OH oder -SH substituiert, oder -NR221R222 sein kann, wobei R221 und R222 gleich oder verschieden und -H, C1 bis C10-Alkyl, -Aralkyl, -Aryl, oder C1-C10-Alkylpolyether mit 1 bis 5 Ethergruppen, sein können, wobei R23 = -H, C1-C10-Alkyl, -Aralkyl, -Aryl, oder C1-C10-Alkylpolyether mit 1 bis 5 Ethergruppen, nicht, einfach oder mehrfach substituiert, insbesondere -OH oder -SH substituiert, sein kann. Beispiele für Menthyl-derivate sind. Isopulegol (... = Doppelbindung, ... = keine Bindung, R2 = -OH), Menthoxypropan-1,2-diol (... = Einfachbindung, ... = Einfachbindung, R1 = -H, R2 = -O-CH2-CHOH-CH2-CH2OH), N-Ethyl-p-menthan-3-carboxamid (... = Einfachbindung, ... = Einfachbindung, R1 = -H, R2 = -CO-NH-CH2-CH3) und p-Menthan-3,8-diol (... = Einfachbindung, ... = Einfachbindung, R1 = -OH, R2 = -OH). Weitere Beispiele sind 3-Menthyl-3,6-dioxaheptanoat, 3-Menthylmethoxyacetat, 3-Menthyl-3,6,9-trioxadecanoat, 3-Menthyl(2-hydroxyethoxy)acetat und Menthyl-11-hydroxy-3,6,9-trioxaundecanoat (... = Einfachbindung, ... = Einfachbindung, R1 = -H, R2 = C1-C10-Alkylpolyether mit 1 bis 5 Ethergruppen, nicht oder

-OH substituiert). Ein weiteres Beispiel ist Menthyllactat (... = Einfachbindung, ... = Einfachbindung, R1 = -H, R2 = -O-CO-R23 und R23 = Hydroxyethyl).

5 Pyrrolidinylderivate des Furanon können insbesondere gemäß Formel II aufgebaut sein, wobei R1 und R2 zumindest einfach vorliegen, wobei die Bindung von R1 und R2 an jeder freien Kohlenstoffvalenz des Furanonringes erfolgen kann, wobei freie Kohlenstoffvalenzen durch Wasserstoff
10 abgesättigt sind, wobei R1 Pyrrolidin, nicht, einfach oder mehrfach substituiert sein kann, insbesondere durch C1-C10-Alkyl, -Aralkyl, Aryl, -OH, -NH2, wobei Pyrrolidin vorzugsweise über N an den Furanonring gebunden ist, wobei R2 = C1-C10-Alkyl, -Aralkyl, -Aryl, -OH, -NH2 sein kann,
15 und wobei vorzugsweise R2 einfach oder zweifach vorliegt und wobei R1 vorzugsweise einfach vorliegt. Beispiele sind: 5-Methyl-4-(1-pyrrolidinyl)-3-[2H]-furanon, 4,5-Dimethyl-3-(1-pyrrolidinyl)-2-[5H]-furanon, 4-Methyl-3-(1-pyrrolidinyl)-2-[5H]-furanon.

20

Icilin ist in Formel III dargestellt. Mit umfaßt sind auch Icilinderivate, welche TRPM8 aktivieren. Dies läßt sich gemäß der Ausführungsbeispiele unschwer testen.

25 Allen genannten Stoffen gemeinsam ist, dass sie Kälteempfinden bei Kontakt mit Haut oder Schleimhäuten auflösen.

Eine erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung kann mit üblichen Hilfs- und Trägerstoffen in fachüblicher Weise
30 galenisch hergerichtet werden, vorzugsweise zur Injektion, i.v., i.p. oder i.m., oder Infusion. Die Dosis liegt vorzugsweise im Bereich von 0,1 bis 5000 mg/kg Körpergewicht, vorzugsweise 1 bis 100 mg/kg Körpergewicht, bezogen

auf einen Tag, eingestellt ist, aufteilbar in 1 bis 10 Gabeinheiten. Es ist zweckmäßig, die Zusammensetzung zur kontinuierlichen oder diskontinuierlich periodischen Gabe über einen Zeitraum von zumindest 2 Wochen, vorzugsweise 5 zumindest 8 Wochen, höchstvorzugsweise zumindest 20 Wochen, herzurichten. Hiermit verbunden ist ein Behandlungsplan, welcher die andauernde Gabe in diesen Zeiträumen vorsieht. Eine diskontinuierliche periodische Gabe erfolgt dadurch, dass in definierten Zeitperioden einmalige Gabe 10 erfolgen. Die Zeiträume können beispielsweise im Bereich von 1 Stunde bis 7 Tage liegen. Eine kontinuierliche Gabe erfolgt mit geeigneten Systemen, welche eine kontinuierlich Freisetzung der Substanz bewirken. In Frage kommen beispielsweise an bzw. in polymere Mikropartikel adsorbierte 15 therapeutische Substanzen, wobei die Substanzen langsam aus den injizierten Mikropartikeln freigegeben werden. Solche Systeme sind in umfangreichen Varianten dem Durchschnittsfachmann bekannt. Zu den kontinuierlich Wirkstoffe abgebenden Systemen gehören auch transdermale Systeme, 20 welche dem Durchschnittsfachmann ebenfalls in umfangreichen Varianten bekannt sind.

Die Erfindung lehrt schließlich auch ein Verfahren zur Behandlung von Tumorerkrankungen, insbesondere Prostata- 25 krebs, wobei einem erkrankten Patienten eine physiologisch wirksame Dosis einer TRPM8 hemmenden Substanz, dargereicht wird.

Im Rahmen der Erfindung ist es möglich, die erfindungsge- 30 mäßen pharmazeutischen Zusammensetzungen in Verbindung mit lokaler Hypothermie einzusetzen, wobei die zu behandelnden Gewebe vorzugsweise auf eine Temperatur unterhalb 36 °C, insbesondere unterhalb 30°C, vorzugsweise unterhalb 25 °C,

gekühlt werden. Die Hypothermie kann kontinuierlich oder diskontinuierlich erfolgen. Im Falle der diskontinuierlichen Hypothermie kann diese vor während und/oder nach der Gabe der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung erfolgen.

Definitionen.

- 10 Im Rahmen dieser Beschreibung wird die Bezeichnung TRPM8 für alle humanen Isoformen, bekannt oder neu, auf Aminosäurenbasis, verwendet. Im Rahmen dieser Beschreibung wird TRPM8 auch Trpp8 genannt. Insbesondere sind die durch die in den Sequenzprotokollen offenbarten Nukleinsäuren
- 15 codierten Proteine und Peptide sowie die in den Sequenzprotokollen offenbarten Proteine bzw. Peptide umfaßt, ebenso wie die in den angegebenen Literaturstellen offenbarten TRPM8 Sequenzen bzw. die dadurch codierten Proteine oder Peptide. Mit diesem Begriff mit umfaßt sind auch die
- 20 im Rahmen dieser Beschreibung offenbarten kurzen Sequenzen, welche aus den Isoformen stammen, beispielsweise Immunisierungssequenzen. Weiterhin mit umfaßt sind auch Homologe, wobei die Homologie zumindest 80%, vorzugsweise mehr als 90%, höchstvorzugsweise mehr als 95%, beträgt,
- 25 und zwar berechnet gemäß dem Programm BLAST in der am Anmeldetag aktuellen Fassung. Weiterhin sind Sequenzen umfaßt, welche lediglich Teilsequenzen der explizit offenbarten Sequenzen, beispielsweise ein Exon oder mehrere Exons, oder komplementärer Sequenzen hierzu darstellen,
- 30 mit der Maßgabe, daß diese mit zumindest gleicher Affinität an ein protein- oder peptidspezifisches Zielmolekül, insbesondere die erfindungsgemäß verwendeten Substanzen, binden.

Im Zusammenhang mit erfindungsgemäßen Verwendungen umfassen die Begriffe der Proteine bzw. Peptide neben den Volllängen der offenbarten Sequenzen (siehe auch vorheriger Absatz) auch Teilsequenzen hieraus, und zwar mit einer Mindestlänge von 4 Aminosäuren, vorzugsweise 10 bis 30 Aminosäuren.

Der Begriff der Behandlung umfaßt auch die Prophylaxe.

10

Eine Tumorzelle überexprimiert TRPM8, wenn die Menge gebildeter TRPM8 RNA oder gebildeten TRPM8 Proteins in einer Tumorzelle höher ist als in Normalzellen gleichen Gewebetyps, vorzugsweise vom gleichen Patienten herrührend. Es versteht sich, dass für den Vergleich Tumor/Normal die gleichen Messverfahren verwendet werden. Dem Fachmann sind verschiedene Messverfahren zur Bestimmung von Nukleinsäuren und/oder Proteinen bzw. Peptiden in Zellen bekannt, welche alle anwendbar sind.

20

Als Aktivator ist eine Verbindung oder Substanz bezeichnet, welche entweder die Bildung von TRPM8 fördert oder die Aktivität von gebildetem TRPM8 erhöht, bezogen auf die TRPM8 Aktivität in Abwesenheit des Aktivators. Insofern kann ein Aktivator einerseits eine Substanz sein, welche in der Entstehungskaskade von TRPM8 aktivierend eingreift. Auf der anderen Seite kann ein Aktivator eine Substanz sein, welche mit gebildetem TRPM8 eine Bindung eingeht, und zwar dergestalt, dass weitere physiologische Wechselwirkungen mit endogenen Substanzen erhöht sind, verglichen mit den gleichen Wechselwirkungen, jedoch ohne Bindung des Aktivators. Ein Aktivator erhöht vorzugsweise bei Kontakt mit TRPM8 exprimierenden Zellen erhöht den Transport von

Ionen in eine Zelle hinein oder daraus heraus gegenüber einer Zelle mit gleichem TRPM8 Expressionsniveau, jedoch ohne Kontaktierung mit den Aktivator. Der Ionentransport läßt sich beispielsweise gemäß der Literaturstelle Peier 5 et al., Cell 108(5):705-715 (2002) bestimmen.

Die galenische Herrichtung einer erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung kann in fachüblicher Weise erfolgen. Als Gegenionen für ionische Verbindungen kommen 10 beispielsweise Na^+ , K^+ , Li^+ oder Cyclohexylammonium infrage. Geeigente feste oder flüssige galenische Zubereitungsformen sind beispielsweise Granulate, Pulver, Dragees, Tabletten, (Mikro-) Kapseln, Suppositorien, Sirupe, Säfte, Suspensionen, Emulsionen, Tropfen oder injizierbare Lösun- 15 gen (i.v., i.p., i.m.) sowie Präparate mit protrahierter Wirkstoff-Freigabe, bei deren Herstellung übliche Hilfsmittel wie Trägerstoffe, Spreng-, Binde-, Überzugs-, Quellungs-, Gleit- oder Schmiermittel, Geschmacksstoffe, Süßungsmittel und Lösungsvermittler, Verwendung finden. Als 20 Hilfsstoffe sei Magnesiumcarbonat, Titandioxyd, Lactose, Mannit und andere Zucker, Talcum, Milcheiweiß, Gelatine, Stärke, Zellulose und ihre Derivate, tierische und pflanzliche Öle wie Lebertran, Sonnenblumen-, Erdnuss- oder Sesamöl, Polyethylenglycole und Lösungsmittel, wie etwa steriles Wasser und ein- oder mehrwertige Alkohole, beispielsweise Glycerin, genannt. Eine erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung ist dadurch herstellbar, dass mindestens ein erfindungsgemäß verwendeter TRPM8 Aktivator in definierter Dosis mit einem pharmazeutisch geeigneten 25 und physiologisch verträglichen Träger und ggf. weiteren geeigneten Wirk-, Zusatz- oder Hilfsstoffen mit definierter Dosis gemischt und zu der gewünschten Darreichungsform hergerichtet ist. 30

Im Rahmen der vorstehenden Definition gegenüber dem engen Wortsinn erweiterte Begriffsbestimmungen umfassen auch die bestimmten Begriffe im engen Wortsinn. Ausführungen zu
5 einer Anspruchskategorie sowie zu einem selbstständigen Anspruch abhängige Ansprüche gelten entsprechend auch für Ansprüche anderer Kategorie.

10 Ausführungsbeispiele:

Beispiel 1: Verringerung der Koloniebildungsrate.

HEK293 Zellen wurden nicht transfiziert, mit TRPM8 trans-
15 fizierte oder mit einem Leervektor transfiziert. Die Zellen wurden in einem Soft Agar Assay (siehe Literaturstelle Shappel et al., Cancer Research 61:497-503 (2001)) eingesetzt. Die stark vereinzelt ausplattierten und im Agar immobilisierten Zellen wachsen dabei dreidimensional und
20 substratunabhängig. Die Koloniebildungsrate erlaubt Rückschlüsse auf die Tumorgenität der Zellen. Je 1000 Zellen wurden in der 6-Lochplatte in 2 ml Softagar-haltigem Medium ausplattiert und nach Erstarren des Agars mit 1 ml Medium (DMEM mit 10% FKS, 2mM Glutamin) überschichtet. Men-
25 thol, gelöst in Ethanol, wurde dem Medium in Endkonzentrationen von 10, 100 und 1000 μ M zugegeben und jeden fünften Tag substituiert. Als Kontrolle wurde lediglich das Lösungsmittel zugegeben. Nach drei Wochen wurden die Anzahl der gebildeten Kolonien unter dem Mikroskop bestimmt. Die
30 TRPM8 transfizierten Zellen zeigen deutlich geringere Koloniebildung als die Wildtyp Zellen und die mit dem Leervektor transfizierten Zellen.

Beispiel 2: Tumorwachstum in Nacktmäusen.

Humane TRPM8 cDNA wurde in den Expressionsvektor pcDNA3.1
5 subkloniert und anschließend stabil in HEK293 Zellen
transfiziert. Die Expression von TRPM8 Protein wurde im
Western-Blot mit TRPM8-spezifischen Antikörpern nachgewie-
sen. Für die Untersuchung der Wirkung von Menthol oder
Icilin auf das Tumorwachstum in vivo wurden je 2 Millionen
10 HEK293-TRPM8 Zellen in männliche Nacktmäuse subkutan inji-
ziert oder in der Prostata xenotransplantiert. Die Ver-
suchsgruppen bestanden aus jeweils 10 Tieren. Die Kon-
trollgruppen wurden nicht bzw. nur mit DMSO behandelt.
Behandelt wurden die Tiere durch tägliche intraperitoneale
15 Applikation von 30 mg/kg Körpergewicht Icilin oder Men-
thol, gelöst in DMSO, über einen Zeitraum von drei Wochen.
Das Wachstum der subkutan injizierten Zellen wurde über
die gesamte Versuchsdauer zweimal wöchentlich vermessen.
Unmittelbar nach Beendigung der Versuche wurden die Xe-
20 notranplantate resektiert, gewogen und asserviert. Im Er-
gebnis zeigten die behandelten Tiere ein deutlich geringe-
res Tumorwachstum als die nicht behandelten Kontrolltiere.

25 Beispiel 3: TRPM8 Sequenzen

In den Sequenzprotokollen sind TRPM8 Sequenzen, insbeson-
dere Splice Varianten angegeben. Im Falle der Nukleinsäu-
resequenzen kodieren diese für Proteine, Peptide oder
30 Teilsequenzen von Proteinen oder Peptiden, die im Rahmen
der Erfindung aktivierbar sind. Im Falle der Aminosäuren-
sequenzen handelt es sich um im Rahmen der Erfindung akti-
vierbare Proteine, Peptide oder Teilsequenzen von

Proteinen oder Peptiden. Weitere Sequenzen für TRPM8 sind der eingangs genannten Literatur zu entnehmen.

5

10

15

20

25

30

Ergänzung Seite 2 Hintergrund der Erfindung

Neuroendokrine Tumoren (NET), die früher auch als Karzinoidtumoren bezeichnet wurden, sind potentiell maligne Tumoren, die sich aus hormonproduzierenden (endokrinen) Zellen entwickeln. NET des Gastrointestinaltraktes werden auch als Gastro-Entero-Pankreatische (GEP) bezeichnet. Auch in Organen der Atemwege z.B. den Bronchien oder der Lunge können NET entstehen. Über die Kalzium-Homöostase dieser seltenen Krebserkrankungen insbesondere die Rolle von TRP Kanälen in NET ist wenig bekannt.

Ergänzung Seite 10 Definitionen

Nanosuspension (Nanokristalle in wässriger Lösung kleiner als 1µm)

Ergänzung Seite 14 Ansprüche

Verwendung nach Anspruch 1 wobei die Tumorerkrankung neuroendokrine Tumoren insbesondere des Gastrointestinaltraktes und der Atmungsorgane sind.

Ersatz Formeln I-III durch neue Zeichnungen**Ergänzung Ausführungsbeispiele**

Aus Beispiel 1 Verringerung der Koloniebildungsrate wird Beispiel 5
Aus Beispiel 2 Tumorwachstum in Nacktmausen wird Beispiel 6
Aus Beispiel 3: TRPM8 Sequenzen wird Beispiel 10

Beispiel 1: Icilin induziert Zytotoxizität in TRPM8 Transfektanden

HEK293 Zellen wurden mit TRPM8 stabil transfiziert (K52) bzw. mit Leervektor stabil transfiziert (M2). Je 5000 Zellen wurden in 96well Platten in 100µl Medium ausplattiert und am nächsten Tag mit Icilin, gelöst in DMSO in den Endkonzentrationen 30µM, 10µM, 3µM versetzt. Als Kontrolle wurden völlig unbehandelte Zellen (Ko) sowie Zellen die mit DMSO in einer Verdünnung entsprechend der höchsten Icilin-Konzentration versetzt wurden, mitgeführt. Nach 48h Inkubation wurden die Zellen unter dem Mikroskop fotografiert. Es zeigte sich ein deutlicher konzentrationsabhängiger zytotoxischer Effekt von Icilin auf HEK293 TRPM8 Transfektanden, aber nicht auf Kontrollzellen. Die Zytotoxizität korreliert

mit einer dramatischen Änderung der Zellmorphologie. Zellmorphologie DMSO hatte keinen Einfluß auf Zellwachstum oder Zellmorphologie.

Beispiel 2: Icilin wirkt anti-proliferatorisch auf TRPM8 Transfektanden

HEK293 Zellen wurden mit TRPM8 stabil transfiziert (K52) bzw. mit Leervektor stabil transfiziert (M2). Je 5000 Zellen wurden in 96well Platten als 6fach Ansatz in 100µl Medium ausplattiert und am nächsten Tag mit Icilin, gelöst in DMSO in den Endkonzentrationen 10µM, 5µM, 1µM und 100nM versetzt. Als Kontrolle wurden völlig unbehandelte Zellen (Ko) sowie Zellen die mit DMSO in einer Verdünnung entsprechend der höchsten Icilin-Konzentration versetzt wurden, mitgeführt. Nach 48h Inkubation wurde die Zellproliferation durch luminometrische Quantifizierung der intrazellulären ATP Konzentration bestimmt. Dargestellt sind die relativen Lichteinheiten (RLU) im Verhältnis zu unbehandelten Kontrollzellen. Die Gegenwart von Icilin bewirkt in TRPM8 positiven Zellen eine deutliche konzentrationsabhängige Inhibition der Proliferation, während keine Effekt auf Kontrollzellen zu beobachten war. Ähnliche Ergebnisse wurden mit anderen Proliferationsassays z.B MTS, MTT, XTT beobachtet.

Beispiel 3: Icilin wirkt pro-apoptotisch auf TRPM8 Transfektanden

HEK293 Zellen wurden mit TRPM8 stabil transfiziert (K52) bzw. mit Leervektor stabil transfiziert (M2). Je 5000 Zellen wurden in 96well Platten als 6fach Ansatz in 100µl Medium ausplattiert und am nächsten Tag mit Icilin, gelöst in DMSO in den Endkonzentrationen 10µM, 5µM, 1µM und 100nM versetzt. Als Kontrolle wurden völlig unbehandelte Zellen (Ko) sowie Zellen die mit DMSO in einer Verdünnung entsprechend der höchsten Icilin-Konzentration versetzt wurden, mitgeführt. Nach 24h Inkubation wurde die Apoptoseinduktion durch fluorometrische Quantifizierung Caspase3/7 Aktivität bestimmt. Dargestellt sind die relativen Lichteinheiten (RLU) im Verhältnis zu unbehandelten Kontrollzellen. Die Gegenwart von Icilin bewirkt in TRPM8 positiven Zellen eine deutliche konzentrationsabhängige Apoptoseinduktion, während keine Effekt auf Kontrollzellen zu beobachten war. Ähnliche Ergebnisse wurden mit anderen Apoptoseassays z.B PARP-Western Blot gemacht.

Beispiel 4: Icilin wirkt anti-proliferatorisch auf LNCaP Zellen

Je 8000 Zellen der Prostata-tumorzelllinie LNCaP wurden in 96well Platten als 6fach Ansatz in 100µl Medium ausplattiert und am nächsten Tag mit Icilin, gelöst in DMSO in den Endkonzentrationen 30µM und 3µM versetzt. Ferner wurden Paclitaxel (Pax) in einer Konzentration von 10nM und in Kombination mit Icilin in den vorher genannten Konzentrationen eingesetzt. Als Kontrolle wurden Zellen, die mit DMSO in einer Verdünnung entsprechend der höchsten Icilin-Konzentration versetzt wurden, mitgeführt. Nach 48h Inkubation wurde die Zellproliferation durch luminometrische Quantifizierung der intrazellulären ATP Konzentration bestimmt. Dargestellt sind die relativen Lichteinheiten (RLU) im Verhältnis zu unbehandelten Kontrollzellen. Die Gegenwart von Icilin bewirkt in

LNCaP Zellen, die TRPM8 endogen exprimieren, eine deutliche konzentrationsabhängige Inhibition der Proliferation, während keine Effekt auf Kontrollzellen zu beobachten war. Auch Paclitaxel wirkt proliferationsinhibierend. Die Kombination von Icilin mit Paclitaxel wirkt stärker proliferationsinhibierend als beide Substanzen allein (Synergismuseffekt). Ähnliche Ergebnisse wurden mit anderen Proliferationsassays z.B. MTS, MTT, XTT beobachtet.

Beispiel 5: Icilin bewirkt eine Verringerung der Koloniebildungsrate

TRPM8 stabil transfizierte HEK293 Zellen (K51, K52) wurden in Softagar immobilisiert. Als Maß für das substratunabhängige Wachstum wurde die Koloniebildungsrate bestimmt. In 2ml Medium in der 6-Loch Platte wurden 1000 Zellen ausplattiert. Die Zugabe von Icilin in den Endkonzentrationen 1µM und 100µM sowie die Lösungsmittelkontrolle DMSO (Ko) entsprechend der höchsten Icilin-Konzentration wurde nach jeweils 48h im Überstand substituiert. Der Überstand (2ml) wurde jeweils nach 96h ausgetauscht. Nach insgesamt 14 Tagen wurden die im Agar gewachsenen Kolonien mit Neutralrot angefärbt, auf Zellstoff getrocknet und fotografiert. Die Zugabe von Icilin bewirkt eine deutliche konzentrationsabhängige Inhibition der Anzahl lebender Kolonien.

Beispiel 6: Icilin reduziert Tumorwachstum in Nacktmausen

TRPM8 stabil transfizierte HEK293 Zellen (K52) wurden intra-peritoneal (i.p.) in Nacktmause xenotransplantiert (NMRI-nu/nu, 9 Wochen alt, männlich, 2 Millionen Zellen pro Tier). Die Tiere wurden jeden 3. Tag über einen Zeitraum von 14 Tagen mit 20µl einer 100mM Icilin-Lösung in DMSO i.p. behandelt. Die Kontrollgruppe wurde unter selben Bedingungen nur mit DMSO behandelt. Das Tumorwachstum wurde durch tägliche Bestimmung des Körpergewichtes verfolgt. Die Icilinbehandlung bewirkte ein deutlich reduziertes Tumorwachstum im Vergleich zur Lösungsmittel-behandelten Kontrollgruppe.

Beispiel 7: TRPM8 ist in neuroendokrinen Tumoren exprimiert

A) Aus einem Lungenadenokarzinom sowie zwei Lungentumoren mit neuroendokriner Differenzierung wurde Tumor -und korrespondierendes Normalepithelgewebe herausgeschnitten. Die mRNA wurde präpariert und die TRPM8 Expression durch RT-PCR Analyse quantifiziert. Gezeigt ist die relative Expression von Tumor- versus Normalepithelgewebe. Die Tumoren mit neuroendokriner Differenzierung zeigen eine deutliche TRPM8 Expression, wohingegen im Adenokarzinom keine relevante TRPM8 Expression vorhanden ist.

B) Aus humanen neuroendokrinen Tumorzelllinien, die aus Pankreaskarzinomen (BON-1, QGP-1) bzw. Kolonkarzinom (LCC-18) stammen, wurde mRNA präpariert und die TRPM8 Expression durch RT-PCR Analyse quantifiziert. Dargestellt ist die relative Expression der mRNA im Vergleich zu TRPM8 positiven LNCaP Prostata Tumorzellen. Alle drei getesteten neuroendokrinen Tumorzelllinien exprimieren TRPM8 in signifikanten Mengen.

Beispiel 8: Icilin wirkt pro-apoptotisch auf neuroendokrine Tumorzellen

Humane neuroendokrine QGP-1 Pankreastumorzellen wurden in 96well Platten als 6fach Ansatz in 100µl Medium ausplattiert (5000 Zellen/well) und am nächsten Tag mit Icilin, gelöst in DMSO in den Endkonzentrationen 100nM, 1µM, 10µM und 100µM versetzt. Als Kontrolle wurden völlig unbehandelte Zellen (Ko) sowie Zellen, die mit DMSO in einer Verdünnung entsprechend der höchsten Icilin-Konzentration versetzt wurden, mitgeführt. Nach 24h Inkubation wurde die Apoptoseinduktion durch fluorometrische Quantifizierung Caspase3/7 Aktivität bestimmt. Dargestellt ist die Apoptoserate im Verhältnis zu Lösungsmittel-behandelten Kontrollzellen. Die Gegenwart von Icilin bewirkt in QGP-1 Zellen eine deutliche konzentrationsabhängige Apoptoseinduktion, während kaum Effekte bei Kontrollzellen zu beobachten war.

Beispiel 9: Iolin wirkt anti-proliferatorisch auf neuroendokrine Tumorzellen

Humane neuroendokrine QGP-1 Pankreastumorzellen wurden in 96well Platten als 6fach Ansatz in 100µl Medium ausplattiert (5000 Zellen/well) und am nächsten Tag mit Icilin, gelöst in DMSO in den Endkonzentrationen 100nM, 1µM, 10µM und 100µM versetzt. Als Kontrolle wurden völlig unbehandelte Zellen (Ko) sowie Zellen, die mit DMSO in einer Verdünnung entsprechend der höchsten Icilin-Konzentration versetzt wurden, mitgeführt. Nach 48h Inkubation wurde die Zellproliferation durch luminometrische Quantifizierung der intrazellulären ATP Konzentration bestimmt. Dargestellt ist die Proliferationsrate im Verhältnis zu Lösungsmittel-behandelten Kontrollzellen. Die Gegenwart von Icilin bewirkt in QGP-1 Zellen eine konzentrationsabhängige Inhibition der Proliferation, während keine Effekt auf Kontrollzellen zu beobachten war. Ähnliche Ergebnisse wurden mit anderen Proliferationsassays z.B MTS, MTT, XTT beobachtet.

Patentansprüche:

1. Verwendung einer TRPM8 aktivierenden Substanz zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Tumorerkrankungen, in welchen TRPM8 überexprimiert ist.
2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Tumorerkrankung Prostatakrebs ist.
3. Verwendung einer Substanz, vorzugsweise nach Anspruch 1 oder 2, welche ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus "Menthol, Menthyl-derivate, Pyrrolidinylderivate des Furanon, Icilin, Icilin-Derivate und Mischungen dieser Substanzen" zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Tumorerkrankungen, insbesondere zur Behandlung von Prostatakrebs.
4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Substanz oder die Mischung solcher Substanzen mit üblichen Hilfs- und Trägerstoffen galenisch hergerichtet wird.
5. Pharmazeutische Zusammensetzung zur Behandlung von Tumorerkrankungen enthaltend eine TRPM8 aktivierende Substanz und/oder eine Substanz, welche ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus "Menthol, Menthyl-derivate, Pyrrolidinylderivate des Furanon, Icilin,

Icilin-Derivate und Mischungen dieser Substanzen" sowie übliche Hilfs- und Trägerstoffe, vorzugsweise galenisch zur Injektion, i.v., i.p. oder i.m., oder Infusion hergerichtet.

5

6. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 5, wobei die Dosis im Bereich von 0,1 bis 1000 mg/kg Körpergewicht, vorzugsweise 1 bis 100 mg/kg Körpergewicht, bezogen auf einen Tag, eingestellt ist, aufteilbar in 1 bis 10 Gabeeinheiten.

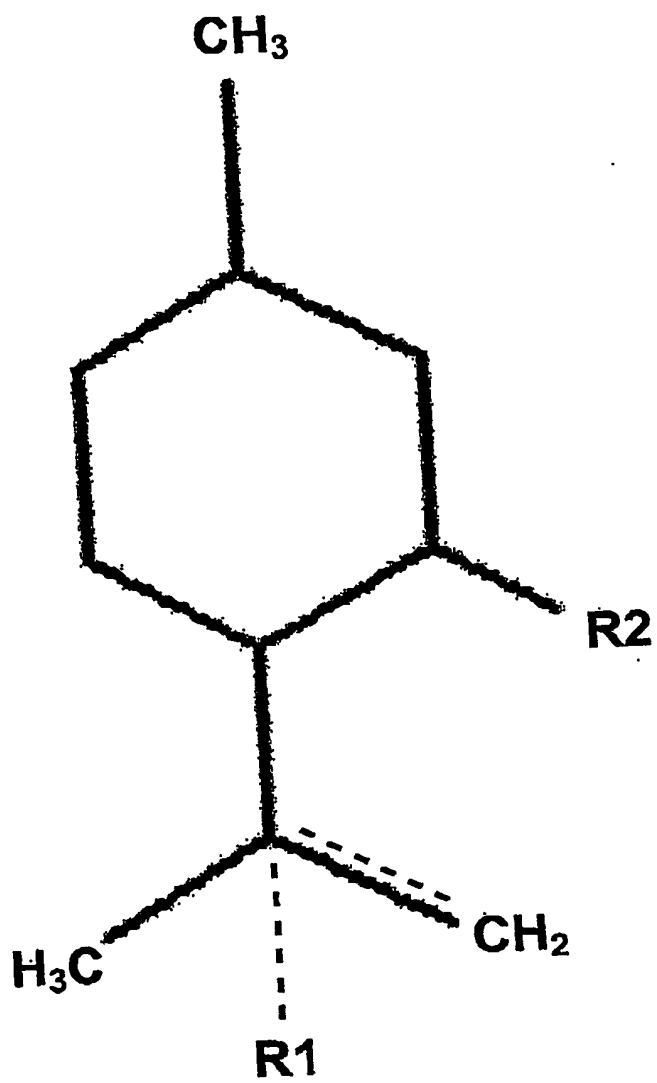
7. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 5 oder 6, wobei die Zusammensetzung zur kontinuierlichen oder diskontinuierlich periodischen Gabe über einen Zeitraum von zumindest 2 Wochen, vorzugsweise zumindest 8 Wochen, hergerichtet ist.

20

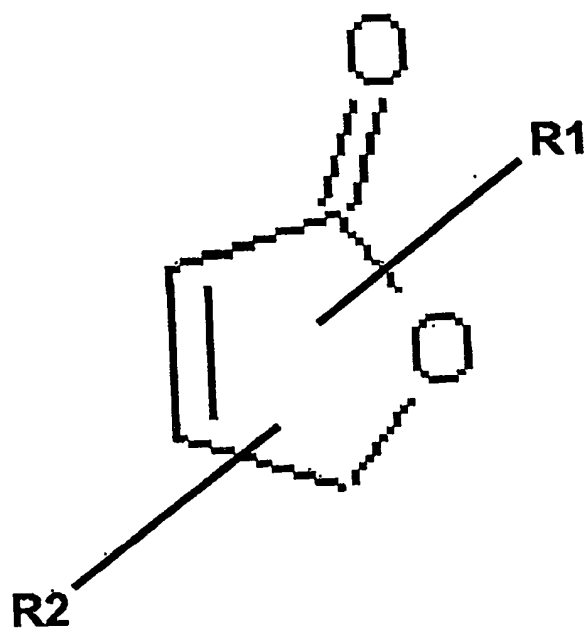
8. Verfahren zur Behandlung von Tumorerkrankungen, insbesondere Prostatakrebs, wobei einem erkrankten Patienten eine physiologisch wirksame Dosis einer TRPM8 hemmenden Substanz, insbesondere eine pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 5 bis 7, dargereicht wird.

25

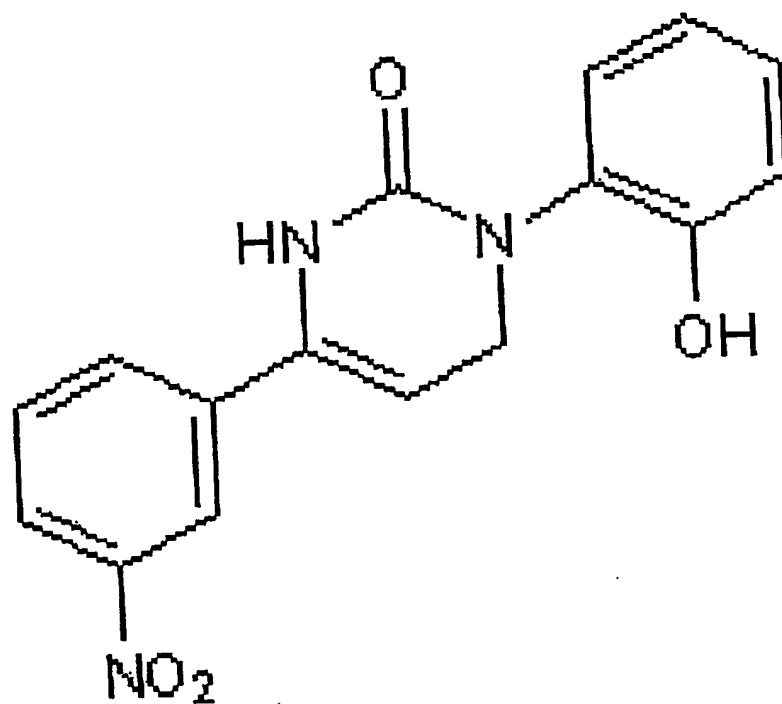
30



Formel I
Fig. 1



Formel II
Fig. 2



Formel III
Fig. 3

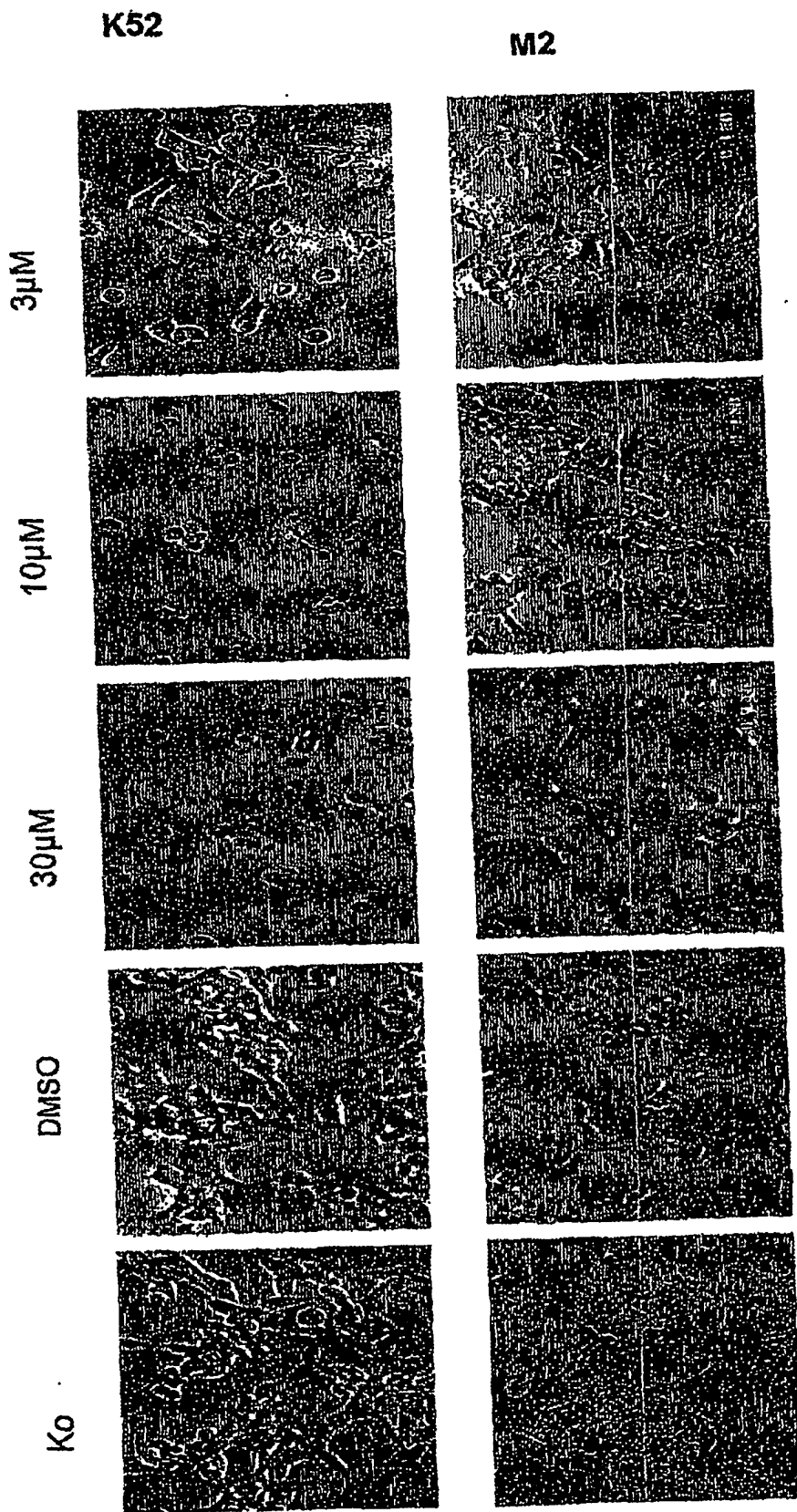
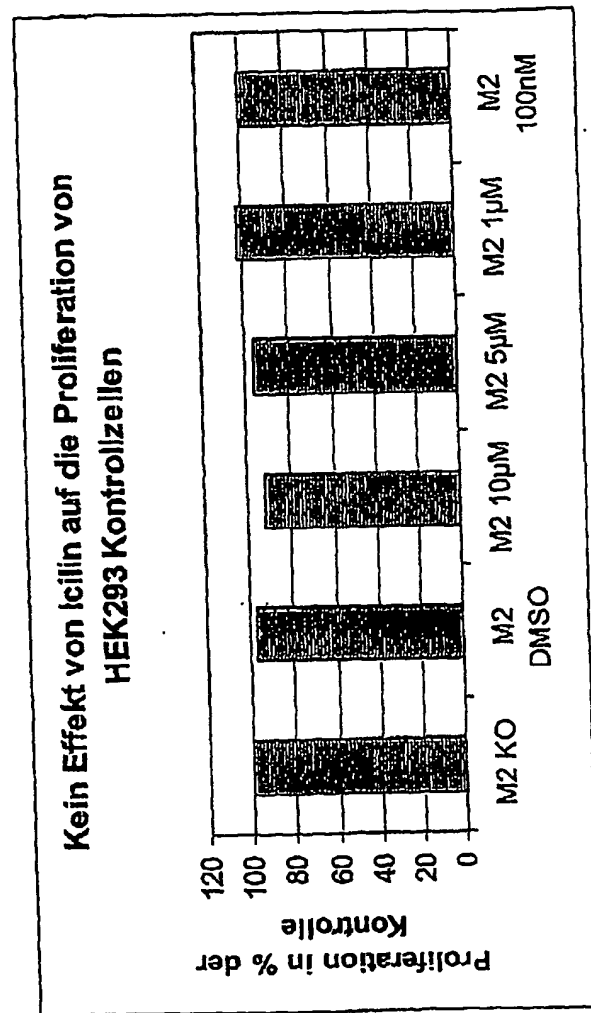
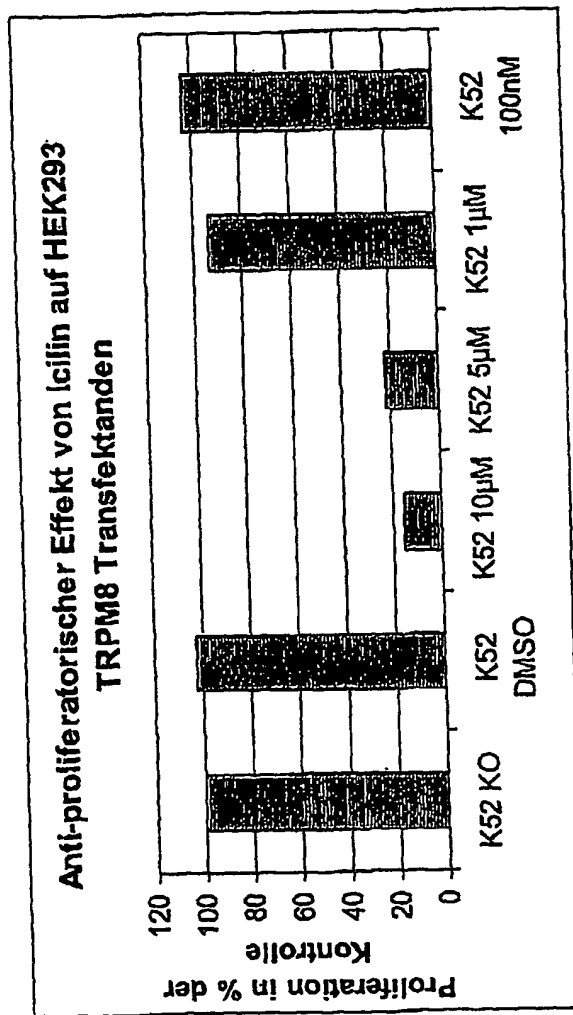


Fig. 4

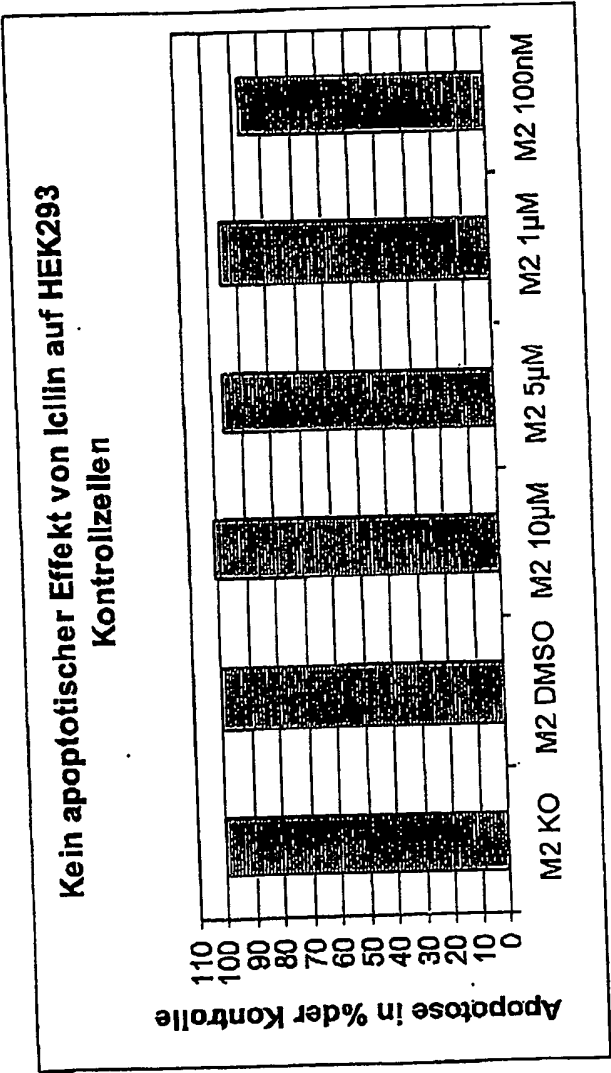
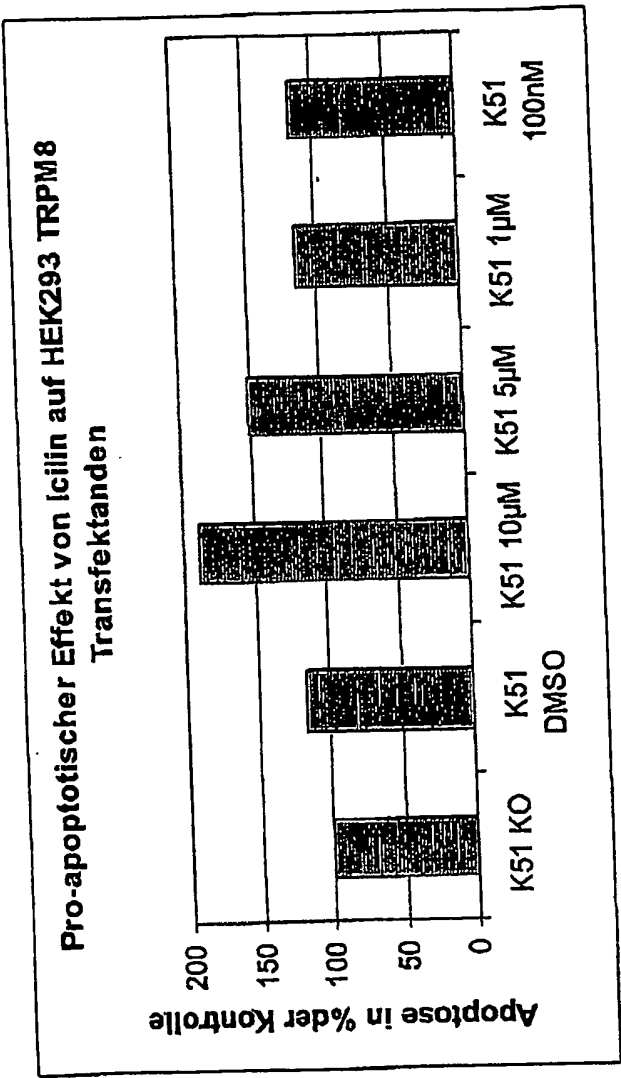
Beispiel 1

Fig. 5



Beispiel 2

Fig 6



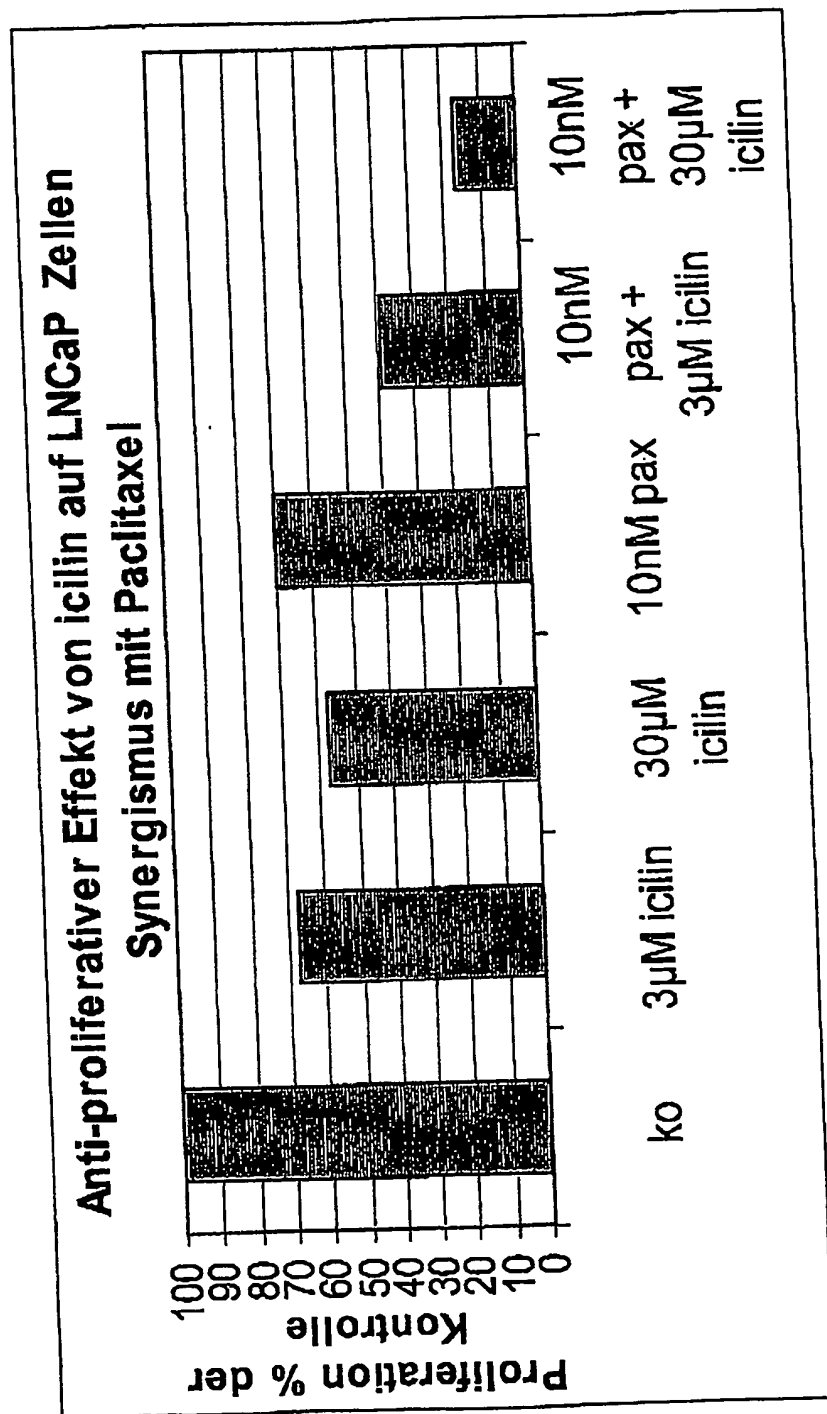


Fig. 7

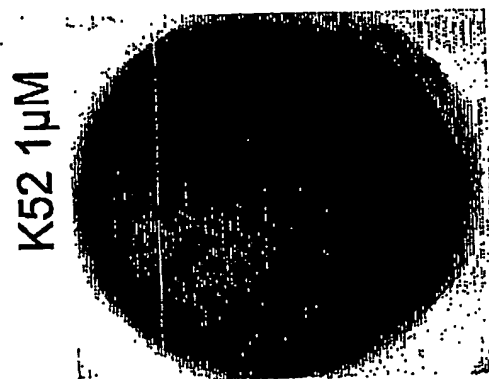
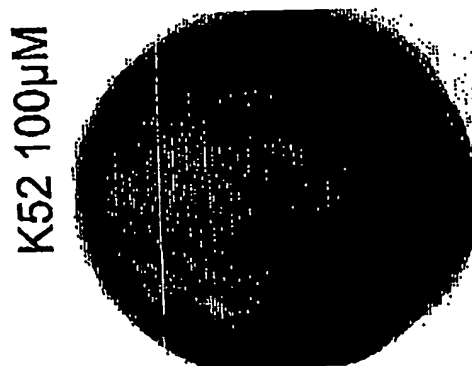
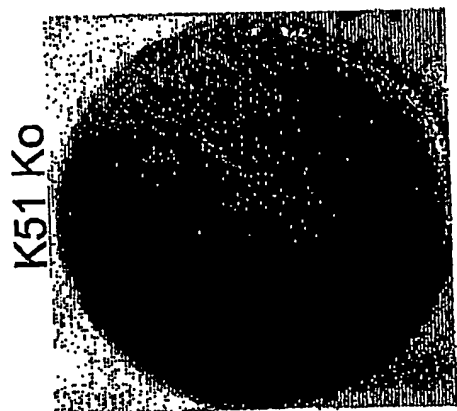
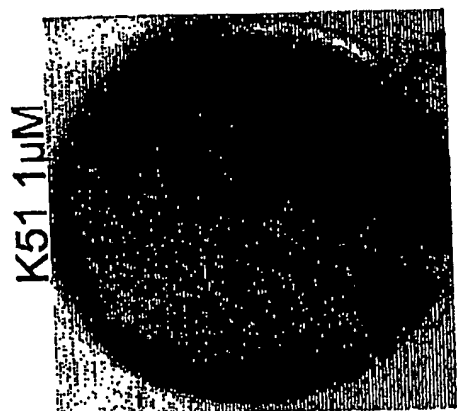
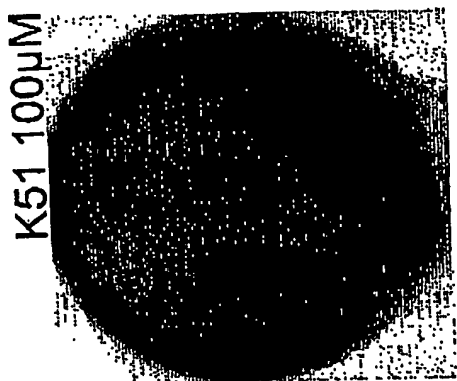


Fig. 8

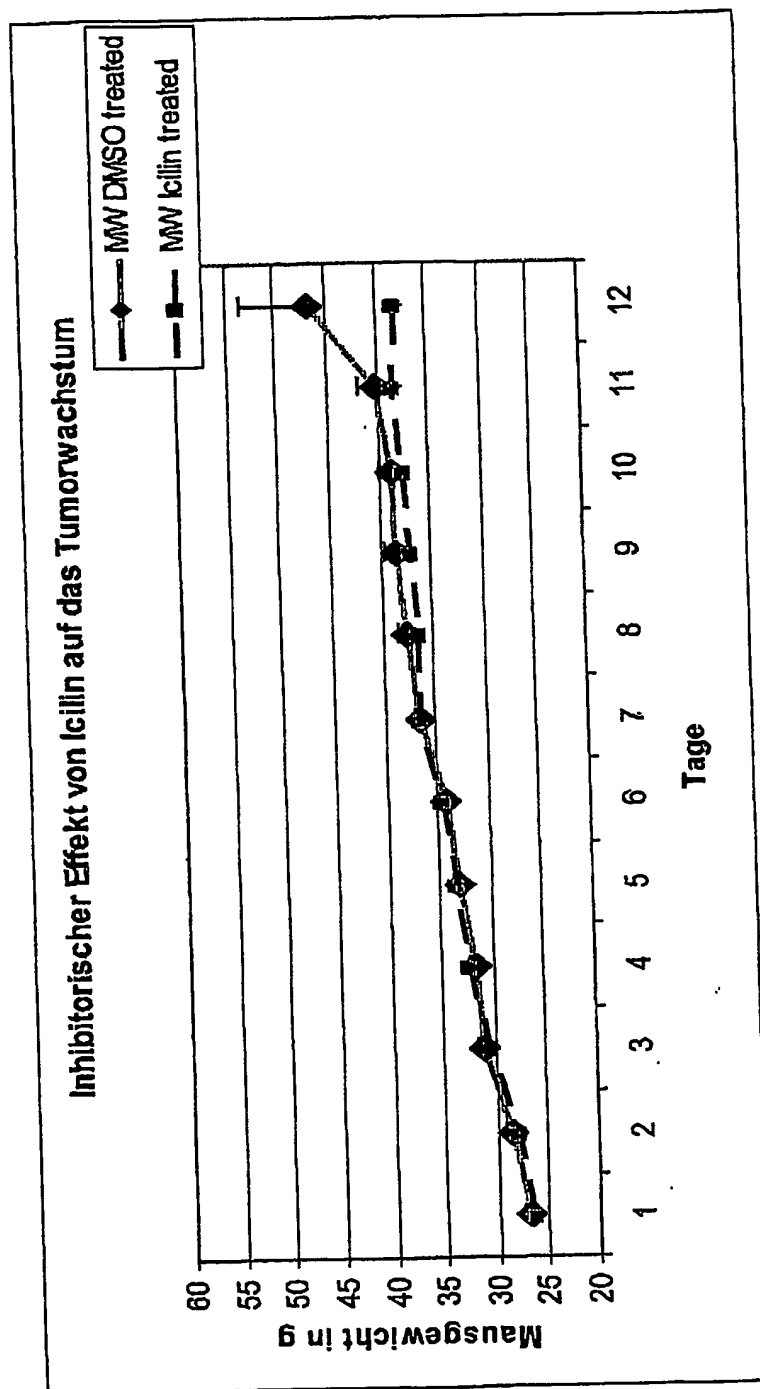
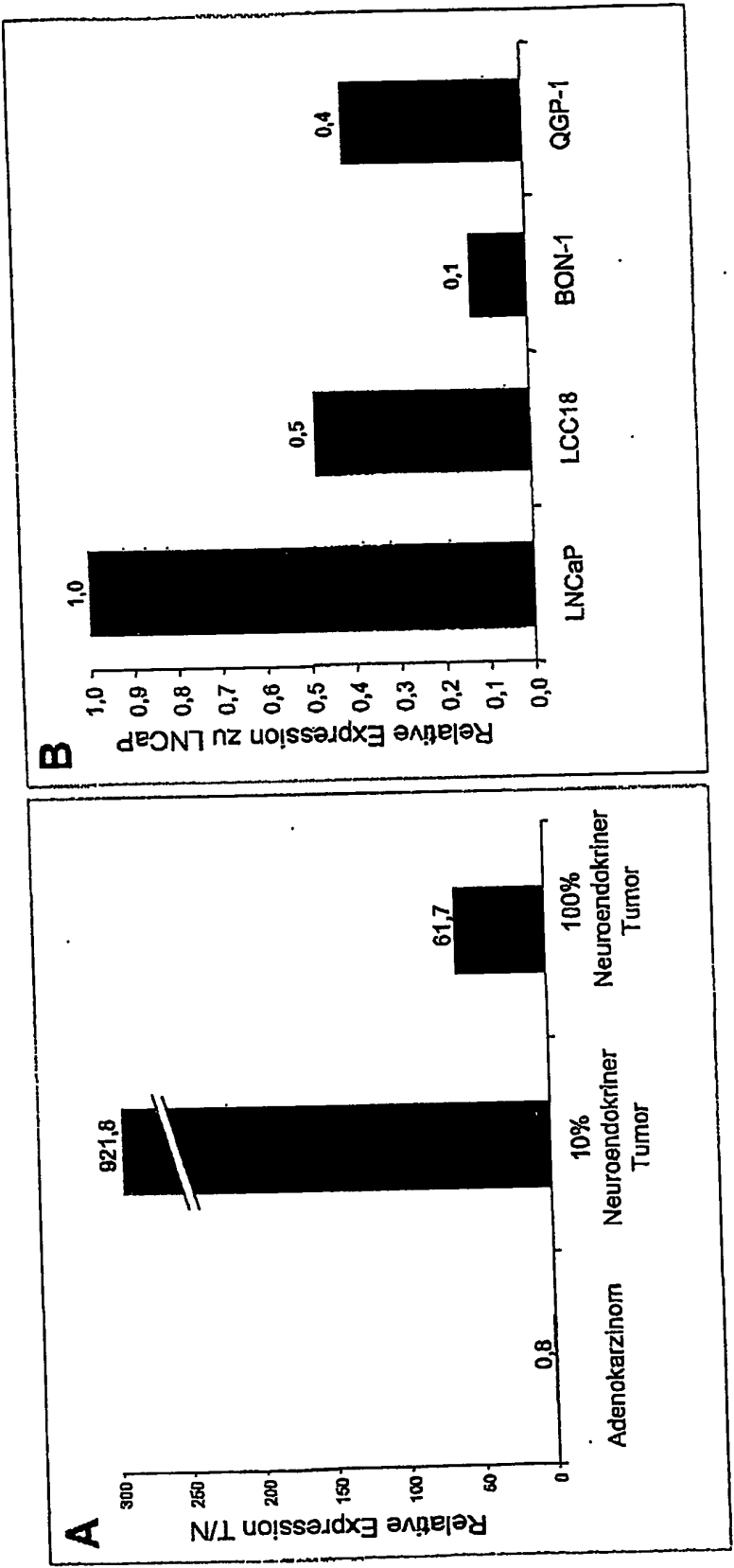


Fig. 9

Fig. 10



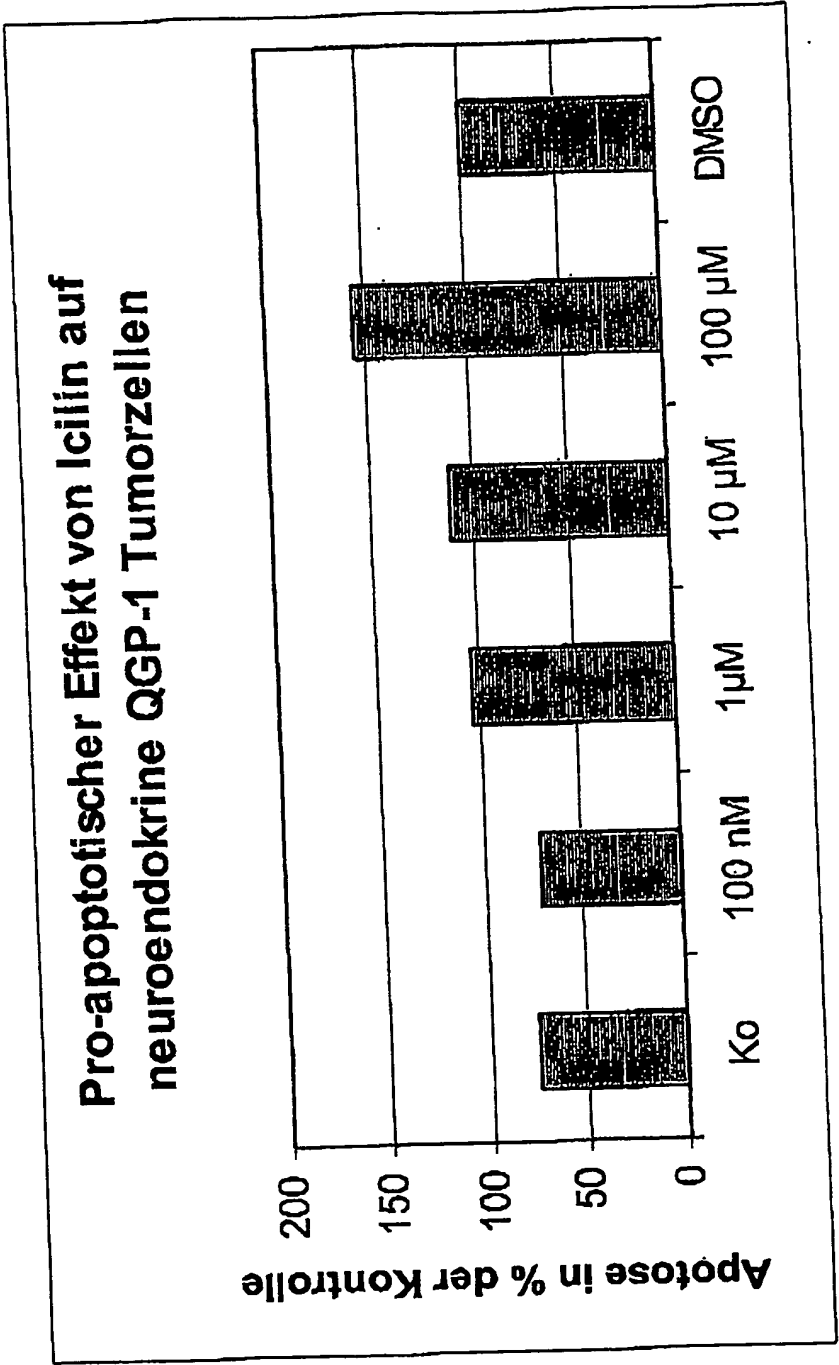


Fig. 11

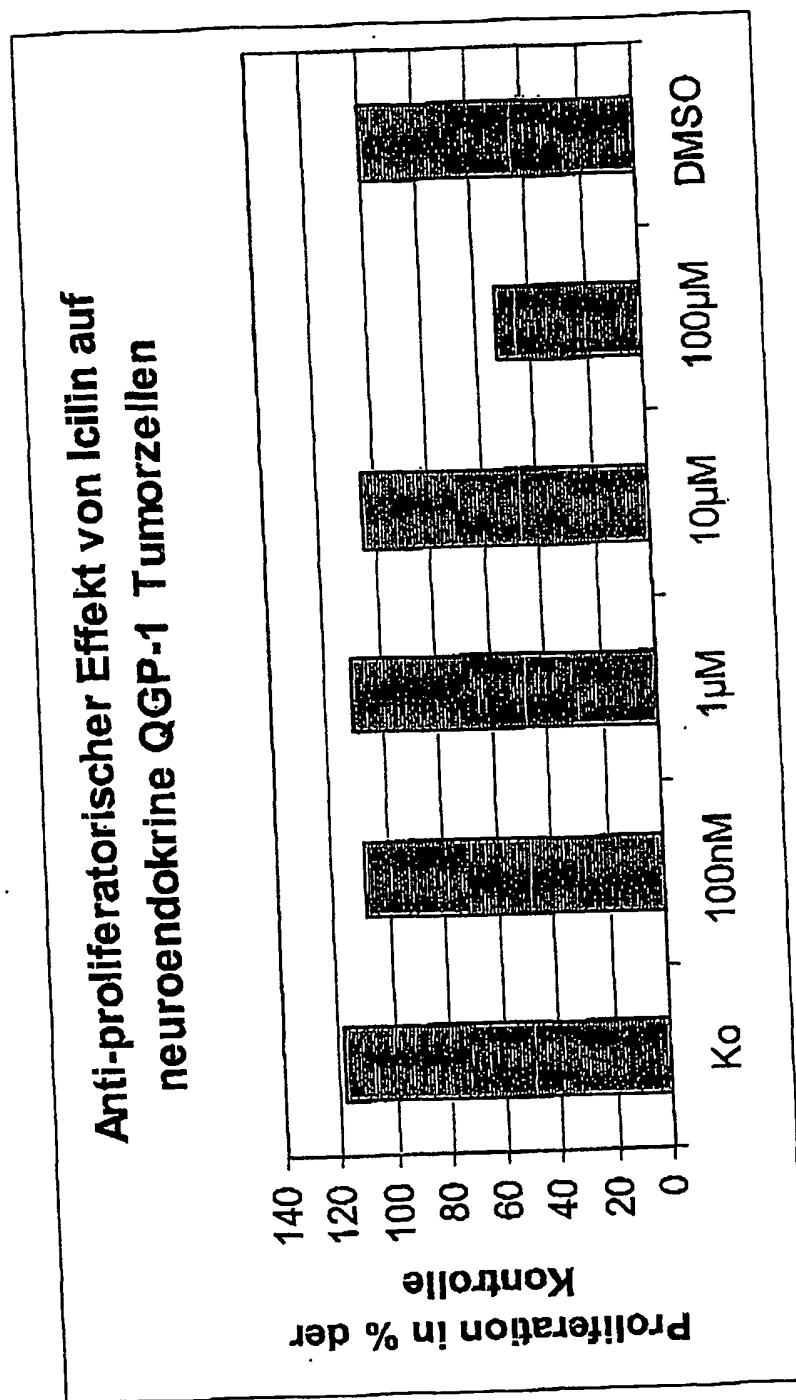


Fig. 12

SEQUENCE LISTING

<110> metaGen Pharmaceuticals GmbH
 <120> Verwendung einer TRPM8 aktivierenden Substanz zur Tumorbehandlung
 <130> MET/DE/0227
 <160> 17
 <170> PatentIn version 3.1

<210> 1
 <211> 1000
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 atccttgggt gaaagaaaat cctgcttgac aaaaaccgtc acttaggaaa agatgtcctt 60
 tcgggcagcc aggctcagca tgaggaacag aaggaatgac actctggaca gcacccggac 120
 cctgtactcc agcgcgtctc ggagcacaga cttgtcttac agtgaaagcg acttggtgaa 180
 ttttattcaa gcaaatttta agaaacgaga atgtgtcttc ttaccaaaag attccaaggc 240
 cacggagaat gtgtgcaagt gtggctatgc ccagagccag cacatggaag gcacccagat 300
 caaccaaagt gagaaatgga actacaagaa acacaccaag gaatttccta ccgacgcctt 360
 tggggatatt cagtttgaga cactggggaa gaaaggggaag tatatacgtc tgccttgcca 420
 cacggacgcg gaaatccttt acgagctgct gaccagcac tggcacctga aaacacccaa 480
 cctggtcatt tctgtgaccg ggggcgccaa gaacttcgcc ctgaagccgc gcatgcgcaa 540
 gatcttcagc cggctcatct acatcgcgca gtccaaaggt gcttggattc tcacgggagg 600
 caccattat ggcctgatga agtacatcg ggaggtgggtg agagataaca ccatcagcag 660
 gagttcagag gagaatattg tggccattgg catagcagct tggggcatgg tctccaaccg 720
 ggacaccctc atcaggaatt gcgatgctga ggtaccggtg ggacaggagg aggtctgcta 780
 ggtcacatgg aagaaagacc atggcatggg cctgtggcct gaaccctggg gctctgtgat 840
 ggagccagcc agatcatggg gaagtctgcc tttcaaggag tgcctttggg accttaaagg 900
 aattgaaaac aaggatgacg tacctaatta actgctggga aagagttaac aatgaatggt 960
 ttgttcatta aaatgtgttc tcagcaaaaa aaaaaaaaaa 1000

<210> 2
 <211> 391
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 gccgactact actacctact actactaaat tcacggccgg tcgactgaag acttggcaga 60

acagctgctg gtctattcct gtgaagcttg gggtggaagc aactgtctgg agctggcggt 120
ggaggccaca gaccagcatt tcacgcccc gcctgggggc cagaattttc tttctaagca 180
atggtatgga gagatttccc gagacaccaa gaactggaag attatcctgt gtctgtttat 240
tatacccttg gtgggctgtg gctttgtatc atttaggtac aaaccaaggc acataatcgt 300
gtgtgagtggt gtgtgccagt gtgtgtacat gcacccacat atgtgtgctc tcatgtaa 360
gattaaaaag cctggaactt aaaaaaaaaa a 391

<210> 3

<211> 2136

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

ggactacatt attttcactc taagattgat ccacattttt actgtaagca gaaacttagg 60
agccaagatt ataatgctgc agaggatgct gatcgatgtg ttcttcttcc tgttctctt 120
tgcggtgtgg atggtggcct ttgctgggcc aggcaaggga tccttaggca gaatgagcag 180
cgctggaggt ggatattccg ttcggtcatc tacgagccct acctggccat gttcggccag 240
gtgcccagtg acgtggatgg taagcctgac ttggctcaga tggaaacagc ttggaggagg 300
catttgctcc ctgaaccaac cccaggggt gccccggaga ccgcacttca gaagcacgcg 360
cgtgaaacgg agtccaacat aacagagtac cacgtatgac ttgcccact gcaccttcac 420
tgggaatgag tccaagccta ctgtgtgtgg agctggatga gcacaacctg ccccggttcc 480
ccgagtggat caccatcccc ctgggtgtgca tctacatgtt atccaccaac atcctgctgg 540
tcaacctgct ggtcgccatg tttggctaca cggtgggcac cgtccagaga acaatgacca 600
ggtctggaag ttccagaggt acttctctgt gcaggagtac tgcagccgcc tcaatatccc 660
cttccccctt atcgtcttcg cttacttcta catggtggtg aagaagtgtc tcaagtgttg 720
ctgcaaggag aaaaacatgg agtccttctgt ctgctgtttc aaaaatgaag acaatgagac 780
tctggcatgg gaggggtgtc tgaaggaaaa ctaccttgct aagatcaaca caaaagccaa 840
cgacacctca gaggaaatga ggcacgatt tagacaactg gatacaaagc ttaatgatct 900
caagggtctt ctgaaagaga ttgctaataa aatcaaataa aactgtatga actctaattg 960
agaaaaatct aattatagca agatcatatt aaggaatgct gatgaacaat tttgctatcg 1020
actactaaat gagagatttt cagacccttg ggtacatggg ggatgatttt aaatcacctt 1080
agtgtgctga gaccttgaga ataaagtgtg tgattgggtt catacttgaa gacggatata 1140

```

aaggaagaat atttccttta tgtgtttctc cagaatggtg cctgtttctc tctgtgtctc 1200
aatgcctggg actggagggt gatagtttaa gtgtgttctt accgcctcct ttttccttta 1260
atcttatttt tgatgaacac atatatagga gaacatctat cctatgaata agaacctggt 1320
catgctttac tctgtatttg ttattttggt catttccaat tgattctcta cttttccctt 1380
ttttgtatta tgtgactaat tagttggcat attgttaaaa gtctctcaaa ttaggccaga 1440
ttctaaaaca tgctgcagca agaggacccc gctctcttca ggaaaagtgt tttcatttct 1500
caggatgctt cttacctgtc agaggagggt acaaggcagt ctcttgctct cttggactca 1560
ccaggctcct attgaaggaa ccacccccat tcttaaatat gtgaaaagtc gcccaaatg 1620
caaccttgaa aggcactact gactttgttc ttattggata ctctcttat ttattatttt 1680
tccattaaaa ataatagctg gctattatag aaatttagac catacagaga tgtagaaaga 1740
acataaattg tccccattac ctttaaggtaa tcaactgctaa caatttctgg atggtttttc 1800
aagtctattt tttttctatg tatgtctcaa ttctctttca aaattttaca gaatgttctc 1860
atactacata tatacttttt atgtaagctt tttcacttag tattttatca aatatgtttt 1920
tatttatattc atagccttct taaacattat atcaataatt gcataatagg caacctctag 1980
cgattaccat aattttgtct attgaaggct atctccagtt gatcattggg atgagcatct 2040
ttgtgcatga atcctattgc tgtatttggg aaaattttcc aagggttagat tccaataaat 2100
atctatttat tattcaatat taaaaaaaaa aaaaaa 2136

```

<210> 4

<211> 1813

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

```

gctagaattt accagtaagc catctgattt ccagtaagc catcctgggc ttttcttgt 60
tgaaagcttt ttgattgctg attttcattt tcttcatttg ttgtttgtct gttcaggctt 120
tgtatttctt cttgattcag gtctttgtaa gttgtacatt tctgggatat ttccatttct 180
tctaggttgt ccaccttggt tgcataaat tgttcatact agccccttct gatcccttct 240
atctctatgc cctctgttgt aaggttgtct ttctcatttc tgactgtatt tatttgtatc 300
ttcttccttt tcttaaaagg ttgttgatt ttgtttatct tttcaaaaaa ccaactctta 360
ctttcaatga ttttttttcc cattgttttt caactctctt ttttaaaaat gtattttgct 420

```

```

cttggagttt ttgctctact ttaaacagct tactaaagtc attttactat taacaaatac 480
aaggctcttt caaaagctcc tatagggaat acaaaatttc cccatctcct tataaccagaa 540
aacaaagtta tttacaattc atcttaagtc tcttaatgat ctcaagggtc ttctgaaaga 600
gattgctaataaaaatcaaataaaactgtatgaactctaataggagaaaaatctaattatag 660
caagatcata ttaaggaatg ctgatgaaca attttgctat cgactactaa atgagagatt 720
ttcagacccc tgggtacatg gtggatgatt ttaaatcacc ctagtgtgct gagaccttga 780
gaataaagtg tgtgattggt ttcatacttg aagacggata taaaggaaga atatttcctt 840
tatgtgtttc tccagaatgg tgcctgtttc tctctgtgct tcaatgcctg ggactggagg 900
ttgatagttt aagtgtgttc ttaccgctc ctttttcctt taatcttatt ttgatgaac 960
acatatatag gagaacatct atcctatgaa taagaacctg gtcatgcttt actcctgtat 1020
tgttattttg ttcatttcca attgattctc tacttttccc ttttttgat tatgtgacta 1080
attagttggc atattgttaa aagtctctca aattaggcca gattctaaaa catgctgcag 1140
caagaggacc ccgctctctt caggaaaagt gttttcattt ctcaggatgc ttcttacctg 1200
tcagaggagg tgacaaggca gtctcttgct ctcttggaact caccaggctc ctattgaagg 1260
aaccaccccc attcctaaat atgtgaaaag tcgccccaaa tgcaaccttg aaaggcacta 1320
ctgactttgt tcttattgga tactcctctt atttattatt ttccattaa aaataatagc 1380
tggtatttat agaaatttag accatacaga gatgtagaaa gaacataaat tgtccccatt 1440
accttaaggt aatcactgct aacaatttct ggatgggttt tcaagtctat ttttttcta 1500
tgtatgtctc aattctcttt caaaatttta cagaatgtta tcatactaca tatatacttt 1560
ttatgtaagc tttttcactt agtattttat caaatatggt tttattatat tcatagcctt 1620
cttaaacatt atatcaataa ttgcataata ggcaacctct agcgattacc ataattttgc 1680
tcattgaagg ctatctccag ttgatcattg ggatgagcat ctttgtgcat gaatcctatt 1740
gctgtatttg ggaaaatttt ccaagggttag attccaataa atatctattt attattcaat 1800
attaaaaaaaaaaa 1813

```

<210> 5

<211> 986

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

```

acctggctaa tttttgtatt tttagtagac acgggggttc accatgttgg ccaggctggt 60

```

ctcgaactcc tgacctcagg tgatttgcct gcctcggcct cccaagtgtt gggattacag 120
gcgtgaacca ccgtgtccgg cctcagggtt tcttaattgc agagcttagt gtggtatact 180
ttctgaaggt atctaacagg gaataggggc aaacaaatag ctgcatgctc ctgtcatagt 240
ccaccagcta tgatctgctt aaaacagctg cctgctggtc gccatgtttg gctacacggc 300
gggcaccgtc caggagaaca atgaccaggc ctggaagtgc cagagggtact tcttgggtgca 360
ggagtactgc agccgcctca atatccccctt ccccttcctc gtcttcgctt acttctacat 420
gggtgtgaag aagtgttca agtgttgctg caaggagaaa aacatggagt cttctgtctg 480
ctgtttcaaa aatgaagaca atgagactct ggcattggag ggtgtcatga aagaaaacta 540
ccttgtcaag atcaacacaa aaaccaacga cacctcagag gaaatgaggc atcgatttag 600
acaactggat acaaagatca tattaaggaa tgctgatgaa caattttgct atcgactact 660
aatgagaga ttttcagacc cctgggtaca tgggtggatga ttttaaatca ccctagtgtg 720
ctgagacctt gagaataaag tgtgtgattg gtttcatact tgaagacgga tataaaggaa 780
gaatatttcc tttatgtgtt tctccagaat ggtgcctgtt tctctctgtg tctcaatgcc 840
tgggactgga ggttgatagt ttaagtgtgt tcttacgcgc tcttttttcc tttaatttta 900
tttttgatga acacatatat aggagaacat ctatcctatg aataagaacc tgggtcatgt 960
ttaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 986

<210> 6

<211> 929

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 6

ggcacgagggc tgcctttctc caccagagac tcttcctcag ggaggacttg gtgaatttta 60
ttcaagcaaa ttttaagaaa cgagaatgtg tcttctttac caaagattcc aaggccacgc 120
tcaatgaaat ccttccttcc tgtccacacc atcgtgctta tcagggagaa tgtgtgcaag 180
tgtggctatg cccagagcca gcacatggaa ggcacccaga tcaaccaaag tgagaaatgg 240
aactacaaga aacacaccaa ggaatttcct accgacgcct ttggggatat tcagtttgag 300
aactgggga agaaagggaa gtatatacgt ctgtcctgcg acacggacgc ggaaatcctt 360
tacgagctgc tgaccagca ctggcacctg aaaacaccca acctgggtcat ttctgtgacc 420
gggggcgcca agaacttcgc cctgaagccg cgcattgcgc agatcttcag ccggctcctc 480

tacatcgcgc agtccaaagg tgcttggatt ctacacgggag gcacccatta tggccgatga 540
 agtacatcgg ggaggtggtg agagataaca ccatcagcag gagttcagag gagaatattg 600
 tggccattgg catagcagct tggggcatgg tctccaaccg ggacaccctc atcaggaatt 660
 gcgatgctga ggtaccggtg ggacaggagg aggtctgcta ggtcacatgg aagaaagacc 720
 atggcatggg cctgtggcct gaaccctggg gctctgtgat ggagccagcc agatcatggg 780
 gaagtctgcc tttcaaggag tgcctttggg accttaaagg aattgaaaac aaggatgacg 840
 tacctaatta actgctggga aagagttaac aatgaatggt ttgttcatta aaatgtgttc 900
 tcagcaatct caaaaaaaaa aaaaaaaaaa 929

<210> 7

<211> 735

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 7

ttggccttca gagcaaagaa ggagatctgc atctctacac ccagatggag aatcacccctc 60
 actttgcagc tgaaggcaat gtggagtga tgttatttta taccatttat ttttattatc 120
 tcttcacaac aaacctacta agtcaatggt atgattccat gctgcaaaca aggaaattaa 180
 gcctcagcaa tcttgatatt ctggaacaga acaatccttt aagagatttg gtattgaaga 240
 ccttgttgga aatggatcag acattgcccga gaccactgtc cagacccaac actggaataa 300
 cccaggagag ctctgtgctt acctcccatc ggcggtcatt ggtgaaaatc tcatcattgg 360
 ctaagtccag ctgggtccac tccagcagaa gcttcagctg cccattccag ttatccttgt 420
 cttgctcact ggtgctgaag gctgtgagag ggcaggaaaa gactcaactc accaaaggct 480
 cagaaataag agtgagaacc attcagtgtg gccattatc agagctgttt atcacagatc 540
 gtatttggtc ttaaattgga tctaccagaa gaagacagcc agctttcgat actaacaac 600
 cacaatggaa gatggccgta tttatcattg cctttagcat gttaaagggt acataccaca 660
 ttgaccctgg cagaagcatt cctgatgtgt tggaaaaatt aagagaaata acagttcttt 720
 ggcaataaaa aaaaaa 735

<210> 8

<211> 84

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 8

Gly Leu Gln Ser Lys Glu Gly Asp Leu His Leu Tyr Thr Gln Met Glu
 1 5 10 15

Asn His Pro His Phe Ala Ala Glu Gly Asn Val Glu Leu Met Leu Phe
 20 25 30

Tyr Thr Ile Tyr Phe Tyr Tyr Leu Phe Thr Thr Asn Leu Leu Ser Gln
 35 40 45

Cys Tyr Asp Ser Met Leu Gln Thr Arg Lys Leu Ser Leu Ser Asn Pro
 50 55 60

Asp Ile Leu Glu Gln Asn Asn Pro Leu Arg Asp Leu Val Leu Lys Thr
 65 70 75 80

Leu Leu Glu Met

<210> 9
 <211> 249
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 9
 gtaccggtgg gacaggagga ggtctgctag gtcacatgga agaaagacca tggcatgggc 60
 ctgtggcctg aaccctgggg ctctgtgatg gagccagcca gatcatgggg aagtctgcct 120
 ttcaaggagt gcctttggga ccttaaagga attgaaaaca aggatgacgt acctaattaa 180
 ctgctgggaa agagttaaca atgaatgttt tgttcattaa aatgtgttct cagcaaaaaa 240
 aaaaaaaaaa 249

<210> 10
 <211> 115
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 10
 gtacaaacca aggcacataa tcgtgtgtga gtgtgtgtgc cagtgtgtgt acatgcatcc 60
 acatatgtgt gctctcatgt aaatgattaa aaagcctgga acttaaaaaa aaaaa 115

<210> 11
 <211> 127
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 11
gtaagcctga cttggctcag atggaaacag cttggaggag gcatttgctc cctgaaccaa 60
ccccagggc tgccccggag accgcacttc agaagcacgc gcgtgaaacg gagtccaaca 120
taacaga 127

<210> 12
<211> 571
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 12
gctagaattt accagtaagc catctgattt cccagtaagc catcctgggc ttttctttgt 60
tgaaagcttt ttgattgctg attttcattt tcttcatttg ttgtttgtct gttcaggctt 120
tgtatttctt cttgattcag gtctttgtaa gttgtacatt tctgggatat ttccatttct 180
tctaggttgt ccaccttgtt tgcatataat tgttcatact agcccccttct gatcccttct 240
atttctatgc cctctgttgt aagggtgtct ttctcatttc tgaotgtatt tatttgtatc 300
ttcttccttt tcttaaaagg tttgttgatt ttgtttatct tttcaaaaaa ccaactctta 360
ctttcaatga ttttttttcc cattgttttt caactctctt ttttaaaaat gtattttgct 420
cttggagttt ttgctctact ttaaacagct tactaaagtc attttactat taacaaatac 480
aaggctcttt caaaagctcc tatagggat acaaaatttc cccatctcct tataccagaa 540
aacaaagtta ttacaattc atcttaagtc t 571

<210> 13
<211> 271
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 13
acctgggctaa tttttgtatt tttagtagac acgggggttc accatgttgg ccaggctggg 60
ctcgaactcc tgacctcagg tgatttgcct gcctcggcct cccaagtgtt gggattacag 120
gcgtgaacca ccgtgtccgg cctcagggtt tcttaattgc agagcttagt gtggtatact 180
ttctgaaggc atctaacagg gaataggggc aaacaaatag ctgcatgctc ctgcatagtc 240
ccaccagcta tgatctgctt aaaacagctg c 271

<210> 14
<211> 35
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 14

ctgcctttct ccaccagaga ctcttcctca gggag

35

<210> 15

<211> 46

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 15

gctcaatgaa atccttcctt cctgtccaca ccacgtgct tatcag

46

<210> 16

<211> 255

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 16

gtaccggtgg gacaggagga ggtctgctag gtcacatgga agaaagacca tggcatgggc 60

ctgtggcctg aaccctgggg ctctgtgatg gagccagcca gatcatgggg aagtctgcct 120

ttcaaggagt gcctttggga ccttaaagga attgaaaaca aggatgacgt acctaattaa 180

ctgctgggaa agagttaaca atgaatgttt tggtcattaa aatgtgttct cagcaatctc 240

aaaaaaaaaaaa 255

<210> 17

<211> 128

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 17

tcaggttttc ttaattgcag agcttagtgt ggtatacttt ctgaagggtat ctaacaggga -- 60

ataggggcaa acaaatactg gcatgctcct gtcatagtcc accagctatg atctgcttaa 120

aacagctg 128

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.